

LES MUTATIONS DE LA PROTÉINE TCPR-10 N'INHIBENT PAS L'ACTIVITÉ DE LA RIBONUCLÉASE NI SON ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE

Sara Pereira Menezes¹; Jane Lima dos Santos²; Fabienne Micheli^{1,3}; Abelmon da Silva Gesteira⁴.

¹UESC, Centro de Biotecnologia e Genética, Ilhéus-BA, Brésil.

²UESC, Centro de Biotecnologia e Genética, Ilhéus-BA, Brésil.

³CIRAD, UMR AGAP, Montpellier, France.

⁵Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas-BA, Brésil.

RESUME

La protéine 10 (TcPR-10) liée à la pathogénèse, obtenue à partir d'une bibliothèque d'interactions *Theobroma cacao* - *Moniliophthora perniciosa*, présente une activité antifongique contre ce champignon et agit aussi *in vitro* en tant que ribonucléase. Toutefois, malgré son intérêt biotechnologique, la protéine TcPR-10 présente un potentiel allergénique. L'insertion de mutations dans le motif responsable du potentiel allergénique de la protéine TcPR10 peut produire des protéines avec un pouvoir allergénique réduit. L'objectif de la présente étude était de vérifier les changements potentiels dans la fonction catalytique de la protéine TcPR-10 dus à l'insertion de substitutions de nucléotides. Des mutants de substitution (Thr10Pro, Ile30Val, His45Ser) ont été insérés dans le gène *TcPR-10* par mutagenèse dirigée par extension de recouvrement basée sur une réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Le produit a été cloné dans un vecteur pET28a et exprimé dans des cellules *Escherichia coli* BL21 (DE3). L'activité de la ribonucléase a été vérifiée en incubant un microgramme d'ARN avec la protéine mutante TcPR-10 (1 µg) à 25 °C à différents moments (à 10 minutes, 20 minutes, 1h, 2h et 3h). Le contrôle positif a utilisé la protéine de type sauvage TcPR-10 précédemment caractérisée par l'activité de la ribonucléase. L'activité de la ribonucléase a été déterminée par dégradation totale de l'ARN observée dans 1 % de gel d'agarose. L'activité antifongique des protéines mutantes TcPR-10 a été déterminée en inhibant la croissance des hyphes dicaryotiques brisées de *M. perniciosa* en utilisant des concentrations croissantes des protéines recombinantes (0, 4, 8 et 10 µg/plaque). L'incubation de la protéine TcPR-10 mutante avec l'ARN de *M. perniciosa* à 25 °C à différents moments montre que, bien qu'il y ait eu une légère réduction du taux de dégradation, les insertions n'ont pas altéré l'activité de la protéine ribonucléase. La survie du champignon baisse au fur et à mesure que la concentration de la protéine mutante TcPR-10 augmente, faisant apparaître le même profil que celui observé pour la protéine sauvage. Avec une concentration de 8 mg/mL, la protéine sauvage de TcPR-10 montre un taux d'inhibition de la croissance de 73 % pour le champignon, et de 61 % pour la protéine mutante TcPR-10, sans différence statistique entre les valeurs ($p > 0,05$; test de Tukey). L'effet *in vitro* de la protéine mutante TcPR-10 sur la survie de *M. perniciosa* montre que les changements n'inhibent pas l'activité antifongique de la protéine. En conclusion, les protéines mutantes ne présentent pas de perte des propriétés biotechnologiques intéressantes.